

Mejor ponencia RESIDUOS RADIATIVOS

# Sistema de biorremediación on-line para la eliminación de radionúclidos en aguas radiactivas

J. A. Belinchón, A. M. García, C. Ruibal y D. A. Moreno

En estudios previos desarrollados en la Central Nuclear de Cofrentes (Valencia), se ha observado que los microorganismos presentes en las aguas radiactivas de las piscinas de almacenamiento de combustible nuclear gastado son capaces de colonizar las superficies metálicas de las paredes y conducciones y formar biopelículas sobre éstas. Estas biopelículas retienen los radionúclidos de las aguas contribuyendo a su descontaminación. En este proyecto, se ha diseñado una planta piloto para la biodescontaminación de las aguas radiactivas.

Actualmente el agua radiactiva procedente de las piscinas de combustible se hace pasar por resinas de intercambio iónico que posteriormente tienen que ser gestionadas como residuos radiactivos. En este proyecto, al agua se le hace pasar a través de un biorreactor que contiene ovillos de acero inoxidable susceptibles de ser colonizados por los microorganismos existentes en dichas aguas. A su paso por el biorreactor, el agua entra en contacto con el material del ovillo, formándose una biopelícula que retiene los radionúclidos presentes en el agua. La biopelícula es fácilmente eliminada por cualquier procedimiento convencional de descontaminación radioquímica de materiales y los radionúclidos se pueden concentrar en un volumen pequeño de eluyente para su recuperación, disposición final o contención. A continuación, el material del biorreactor puede ser gestionado como material no radiactivo.

*In previous studies developed in Cofrentes Nuclear Power Plant (Valencia, Spain), has been observed that the microorganisms in the radioactive waters of the spent nuclear fuel pool are capable of colonizing the metallic surfaces of the walls and pipes and perform biofilms. These biofilms retain the nuclides contributing to decontaminate the water. In this project, carried out in Cofrentes Nuclear Power Plant, a pilot plant has been designed for the biodecontamination of the radioactive water.*

*At present, the radioactive water coming from the spent nuclear fuel pools, pass through ionic exchange resins. After, these resins are managed as radioactive waste. In this project, the water passes through a bioreactor with stainless steel balls capable of being colonized by the microorganisms in the water. Inside the bioreactor the water gets in contact with the material of the balls, and a biofilm, which retains the nuclides in the water, is developed. The biofilm is easily removed by any conventional procedure of radiochemical decontamination of materials and the nuclides can be collected in a small volume for recovery, final disposition or containment. Later, the material of the bioreactor could be managed as not radioactive material.*



**JULIO ÁNGEL BELINCHÓN VERGARA**

es licenciado en CC Químicas por la Universidad de Alcalá de Henares y tienen el Diploma de Estudios Avanzados en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Complutense de Madrid. En 2000 comienza su trayectoria laboral en Iberdrola como jefe de Control Químico de Sistemas en la central nuclear de Cofrentes. En 2003 ocupa el puesto de jefe de Organización y Factores Humanos y en 2006 el de jefe de Química y Medioambiente. Desde enero de 2010 es el jefe de la Unidad de Soporte abarcando las organizaciones de Química y Medioambiente, Formación, Servicios de Planta, Servicio Médico y Seguridad Laboral.

Esta ponencia forma parte de la Tesis Doctoral que está realizando en el Departamento de Ingeniería y Ciencia de los Materiales de la ETSII de la Universidad Politécnica de Madrid, codirigida por Ana M. García, y Diego A. Moreno.

## INTRODUCCIÓN

La biorremediación, consiste en el uso de sistemas biológicos para producir rupturas o cambios moleculares en sustancias tóxicas y/o contaminantes en suelos, aguas y aire, para generar compuestos de bajo o nulo impacto ambiental. Las bacterias son los principales microorganismos empleados en estos procesos, aunque algas y hongos también resultan eficaces, y todos ellos pueden emplearse vivos, muertos o, incluso

algunos de sus componentes celulares como enzimas, pared celular, etc.

Aunque los radionúclidos no pueden ser biodegradados, los microorganismos pueden interaccionar con ellos de forma directa o indirecta. La biorremediación de aguas contaminadas con residuos radiactivos depende principalmente de la capacidad de los microorganismos para sobrevivir bajo radiación, por ello, es necesario el aislamiento e identificación de especies resistentes, las cuales pueden

encontrarse en las propias zonas contaminadas. Así, se ha detectado actividad microbiana en centrales nucleares y en zonas de almacenamiento de residuos radiactivos. En este proyecto, las piscinas de almacenamiento de combustible nuclear gastado han sido la fuente de microorganismos. A pesar de tratarse de aguas radiactivas y ultrapuras, por los tratamientos de desionización que se aplican habitualmente en las piscinas para prevenir la corrosión microbiana,

se ha observado el desarrollo de microorganismos.

En general, en los procesos de biorremediación se ha comprobado que la formación de biopelículas incrementa de forma considerable las tasas de eliminación de contaminantes. Las biopelículas son conjuntos de microorganismos embebidos en una matriz exopolimérica de origen microbiano que los mantiene unidos junto con otras sustancias del medio en que se encuentran. Su formación les permite la adhesión a superficies y les confiere mayor resistencia a factores externos adversos como la toxicidad producida por la radiación. Muchos de los microorganismos que conforman las biopelículas experimentan cambios en su morfología y estructura celular, que impiden su crecimiento en medios de cultivo en el laboratorio. Son conocidos como viables pero no cultivables (VBNC) y su detección e identificación requiere técnicas de biología molecular independientes de cultivo. La mayoría de estas técnicas se basan en la amplificación total o parcial del gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosómico (16S rDNA). Este marcador genético, que está evolutivamente conservado, permite no sólo establecer relaciones entre individuos de la misma especie, sino también entre grupos taxonómicos superiores.

En este proyecto se desarrolla un sistema on-line de biorremediación de aguas radiactivas, que permita su descontaminación total o parcial, aprovechando las propiedades de la microflora que se desarrolla de forma natural en las piscinas de almacenamiento de combustible nuclear gastado, formando biopelículas sobre la superficie de materiales metálicos. Los materiales elegidos son ovillos de acero inoxidable fácilmente bioensuciables, es decir, que permiten su colonización y la formación de biopelículas sobre su superficie y de los que puede eliminarse el material biológico una vez que hayan desempeñado su función.

## DESARROLLO DEL PROYECTO Y RESULTADOS

El sistema de biorremediación de aguas radiactivas se llevó a cabo en el edificio de combustible de la Central Nuclear de Cofrentes, en el sistema de limpieza de las piscinas de combustible gastado. Concretamente, la planta piloto se ubicó entre la aspiración y la descarga de las bombas de este sistema aguas arriba de los filtros desmineralizadores (figura 1). Previo a uno de los biorreactores, se instaló una lámpara de luz ultravioleta (UV), con el fin de determinar la resistencia de los microorganismos y cómo afectaría este factor externo al desarrollo de las biopelículas.

Esta planta piloto consta de dos biorreactores en cuyo interior se introducen sendos bastidores (figura 2) donde se colocan los

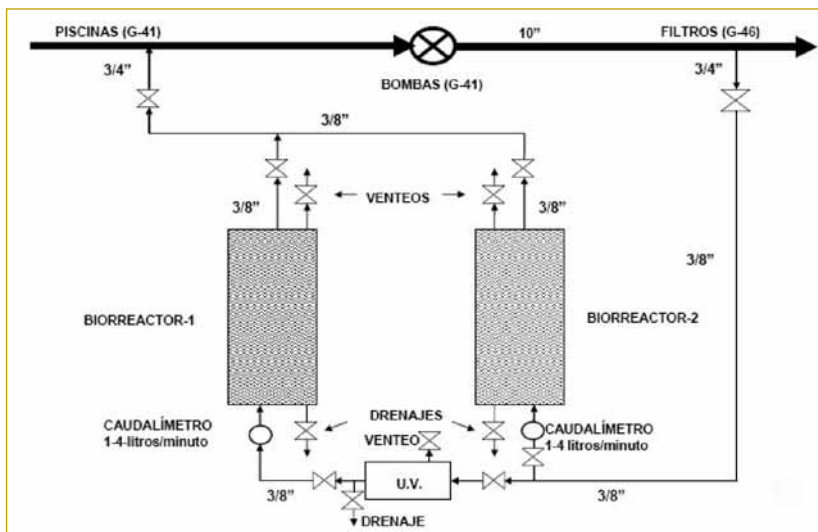


Figura 1. Esquema del sistema de biodescontaminación de las aguas radiactivas de las piscinas utilizado.

ovillos de acero inoxidable. Una vez ejecutada la instalación y realizada una prueba hidrostática para asegurar la estanqueidad del sistema se puso en funcionamiento con un caudal de 1-4 L/minuto.

El sistema estuvo en funcionamiento 635 días; cada dos meses aproximadamente se fueron extrayendo los ovillos de cada biorreactor con el fin de estudiar tanto la formación de las biopelículas como la actividad isotópica retenida en ellas. Las medidas radioquímicas de los materiales extraídos de los biorreactores, así como la preparación de muestras que se utilizaron para la extracción de DNA y microscopía, se realizaron en el Laboratorio de Radioquímica de la Central Nuclear de Cofrentes (Valencia). La clonación de bacterias y la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biodeterioro de la ETSII de la Universidad Politécnica de Madrid.

El estudio de las biopelículas mediante Microscopía Electrónica de Barrido,

ha puesto de manifiesto que los microorganismos presentes en el agua de las piscinas de combustible nuclear gastado son capaces de desarrollarse sobre la superficie del acero inoxidable de los ovillos. No se observaron apenas diferencias entre los ovillos del biorreactor 2 (o control) y el biorreactor 1 (con lámpara UV). Al mes se observan pequeñas colonias microbianas sobre la superficie del material, que van desarrollándose y, al cabo de tres meses, aparecen conectadas entre sí por sustancias poliméricas extracelulares, responsables de la estructura y de muchas de las propiedades de las biopelículas. A partir de entonces empiezan a retener radionúclidos presentes en el agua, contribuyendo a su biodescontaminación. A los seis meses se observa una biopelícula madura en los ovillos sumergidos en ambos biorreactores. Tras quince meses los estudios microscópicos muestran que la biopelícula está envejeciendo. En la extracción de ovillos efectuada después de diecinueve y veintinueve meses, apenas se aprecian



Figura 2. Blindaje soporte (izquierda) y vista superior de los biorreactores en el interior del mismo (derecha).

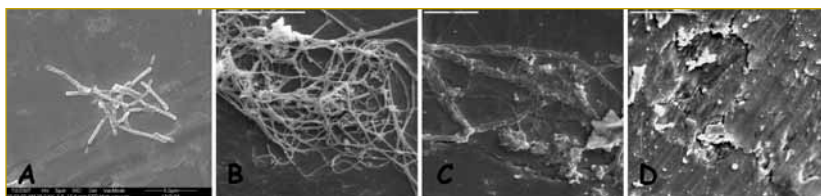


Figura 3. Imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido mostrando las biopelículas formadas sobre los ovillos de acero inoxidable a los tres meses(A), seis meses (B), quince meses (C) y diecinueve meses (D).

células microbianas sobre la superficie del material que aparece ligeramente corroído, observándose asimismo la pérdida de actividad isotópica en los ovillos (figura 3).

La determinación de la radioactividad acumulada por las biopelículas a lo largo del tiempo se realizó mediante espectrometría gamma. No se han observado diferencias significativas en cuanto a la radioactividad acumulada por los ovillos del biorreactor 1 y 2, aunque en general han sido ligeramente mayores en el material del biorreactor 2. Esta radioactividad se encuentra relacionada con la maduración de la biopelícula formada. A los cinco meses se observa un pico de máxima intensidad de unos 2.000 Bq/cm<sup>2</sup> para el material del biorreactor 2 y a los seis meses de unos 1.200 Bq/cm<sup>2</sup> para el material del biorreactor 1. De este estudio isotópico también se concluye que la mayor parte de la actividad retenida corresponde a productos de corrosión presentes en las aguas, siendo el isótopo de mayor presencia el Co-60 (figura 4).

Para la identificación de los microorganismos formadores de las biopelículas sobre los ovillos del material metálico, ha sido necesario poner a punto técnicas innovadoras de extracción de material genético en el propio Laboratorio de Radioquímica de la Central Nuclear de Cofrentes, ya que la radioactividad acumulada por los ovillos de acero inoxidable hacía imposible sacarlos de la central para poder ser procesados. El DNA extraído de las biopelículas desarrolladas sobre los ovillos metálicos se llevó al Laboratorio de Biodeterioro de la UPM. Allí, se amplificó un fragmento del gen

16S rDNA mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa) y se clonó en células competentes de *Escherichia coli* utilizando el TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen). Los clones positivos se secuenciaron en un secuenciador automático y las secuencias de DNA obtenidas para cada fragmento clonado se han comparado en la base de datos pública del NCBI (*National Center of Biotechnology Information*; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) mediante el algoritmo Megablast, que muestra aquellas secuencias con mayor porcentaje de homología.

Los microorganismos formadores de las biopelículas desarrolladas sobre los ovillos de acero inoxidable, pertenecen a los grupos filogenéticos de Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria y Actinobacteria fundamentalmente. La mayor parte de los clones obtenidos no ha podido asociarse con ningún género bacteriano conocido y corresponden a bacterias no cultivables.

La aplicación de las técnicas moleculares independientes de cultivo para la identificación de los microorganismos que constituyen las biopelículas, y concretamente las técnicas de clonación, han puesto de manifiesto que estas biopelículas están constituidas por una pequeña diversidad de microorganismos no cultivables y, cuya importancia en la descontaminación de las aguas radiactivas puede ser muy relevante.

## CONCLUSIONES

Se ha diseñado y construido una planta piloto on-line para el estudio de la biorremediación de aguas radiactivas en la Central Nuclear de Cofrentes. Los resultados obtenidos son prometedores en cuanto al escalado del sistema estudiado.

Se ha constatado el desarrollo de biopelículas microbianas sobre la superficie de los ovillos de acero inoxidable en las condiciones establecidas por este sistema on-line.

Se han identificado los microorganismos integrantes de estas biopelículas mediante técnicas moleculares independientes de cultivo innovadoras en este ambiente nuclear particular.

Se ha demostrado la participación de las biopelículas microbianas en la retención de radionúclidos del agua radiactiva,

poniéndose de manifiesto el proceso de biorremediación planteado.

## REFERENCIAS

- E. Chicote, D.A. Moreno, A.M. García, M.I. Sarró, P.I. Lorenzo, F. Montero. 2004. Biofouling on the Walls of a Spent Nuclear Fuel Pool with Radioactive Ultrapure Water. *Biofouling*, Vol. 20, N° 1, pp. 35-42.
- E. Chicote, A.M. García, D.A. Moreno, M.I. Sarró, P.I. Lorenzo, F. Montero. 2005. Isolation and Identification of Bacteria from Spent Nuclear Fuel Pools. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 32, N° 4, pp. 155-162.
- M.I. Sarró, A.M. García, D.A. Moreno. 2005. Biofilm Formation in Spent Nuclear Fuel Pools and Bioremediation of Radioactive Water. *International Microbiology*, Vol. 8, N° 3, pp. 223-230.
- D.A. Moreno. 2006. Bioremediation of radioactive water in nuclear power plants. Kick-off-Meeting, COST Action D-33, Working Groups 3 & 4 Meeting. 20-21 September 2006, Copenhagen, Denmark.
- D.A. Moreno. 2007. Bioremediation of radioactive water in nuclear power plants. Presentation of Project Progress: Results 2007. COST Action D-33, Working Groups 1 & 3 Meeting. 10-11 March 2008, Preston, United Kingdom.
- A.M. García, C. Ruibal, D.A. Moreno. 2008. Bioremediation of radioactive water in nuclear power plants. Presentation of Project Progress: Results 2008. COST Action D-33, Working Group 3 Meeting. 2-3 November 2008, Madrid, Spain.
- D.A. Moreno. 2008. Biorremediación de aguas radiactivas en centrales nucleares: un procedimiento en estudio. Foro de Innovación de La Rioja-2008. 18-19 de noviembre de 2008, Logroño.
- A.M. García, C. Ruibal, D.A. Moreno. 2009. Bioremediation of radioactive water in nuclear power plants: presentation of final results. COST D33: Nanoscale Electrochemical and Bioprocesses (Corrosion) at Solid-Aqueous Interfaces of Industrial Materials: Final Workshop. 13-15 May 2009, Cluj-Napoca, Romania.
- A.M. García, J.A. Belinchón, C. Ruibal, D.A. Moreno. 2009. Estudio de las biopelículas implicadas en un proceso de biorremediación on-line de aguas radiactivas. XXII Congreso Nacional de Microbiología. 21-24 septiembre 2009, Almería.

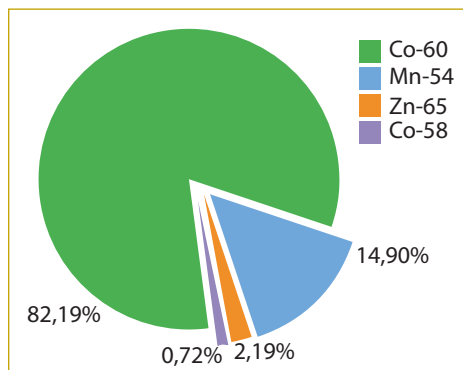


Figura 4. Actividad gamma relativa encontrada en las biopelículas.